

Opponensi vélemény

Dr. Takács István: "A csontvázra ható genetikai és környezeti tényezők klinikai vizsgálata" c. MTA doktori értekezéséről

Minden értekezés készítésének sajátos története van. Szerencsésnek mondhatja magát az, aki olyan egyetemen, intézetben kezdte el vagy folytatja munkáját, amelyikben az elődök hosszú sora kialakította a kutatás életformáját, gondolati, logikai és kísérleti feltétel rendszerét. A Holló István professzor és munkatársai neve által fémjelzett, nemzetközileg is elismert iskolában a pályát elkezdni kitüntető és egyben kötelező feladat. Előre bocsájtom, hogy Takács István dr. tudományos munkáját reprezentáló közleményei és disszertációja alapján jó tanítványnak bizonyult.

Az értekezés 17 közleményen illetve kongresszusi összefoglalón alapszik. A közlemények közül 7-ben első szerző és 15 jelent meg angol nyelvű folyóiratban (némelyik magas impakt faktorúban). Külföldön megjelent publikációi munkájának elismertségét jelzik, összesített impakt faktora: 42,912. Mindezek előrebocsájtását azért tartom szükségesnek, hogy mindenki megbizonyosodjék, a disszertáns eddigi tudományos munkája alapján méltán pályázhat az „MTA Doktor” fokozat elnyerésére.

A 200 oldalas értekezés felépítése a hagyományos szerkezetet követi, amennyiben a részletes bevezetés után taglalja célkitűzéseit, a vizsgálati módszereit, eredményeit és a megbeszélés fejezetben értelmezi a kapott eredményeit és azok klinikai jelentőségét. Az értekezés mind elméleti, mind gyakorlati szempontból lényeges kérdéskörnek, az osteoporosisnak a kialakulásában fontos genetikai kérdésekkel és a betegség kezelésével, ill. megelőzésével kapcsolatos feladatokra igyekezett választ adni.

A „Bevezetés”, „Az értekezés témáinak irodalmi áttekintése” fejezet (65 oldal terjedelemben) tankönyvbe illő részletességgel foglalta össze a csontanyagcserében szerepet játszó örökletes és környezeti faktorokat különös tekintettel az osteoporosisra.

A „Célkitűzések” fejezetben külön 2 fő részre bontotta munkáját:

A csontvázra ható genetikai és környezeti tényezők vizsgálata

1. *A csontvázra ható genetikai tényezők vizsgálata* részben irodalmi adatok alapján legvalószínűbb ún. kandidáns gének osteoporosis kialakulásában betöltött szerepét kívánta meghatározni. Némileg eklektikus módon a VDR, az IL-1ra, az IL-6, az IGF-1, a CaSR, a RANK-RANKL-OPG, az LRP5, a GPR177 és az SP7 gének polimorfizmusainak csontanyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálatára koncentrált.

2. *A csontvázra ható környezeti tényezők vizsgálata* fejezetben azt igyekezett bemutatni, hogy a hazai adatok alapján a modern osteoporosis kezelése bevezetése milyen eredménnyel járt, mennyiben volt hatással a törések gyakoriságának változására és az egészségügyi kiadásokra. Célkitűzései között szerepelt a D-vitamin szintek meghatározása a magyarországi népességre, korra, nemre és lakhelyre reprezentatív mintán történő vizsgálata a leghosszabb UV-B sugárzásmentes periódus után, a tél végén. Továbbá összegezte azt, hogy milyen környezeti tényezők befolyásolják a téli végi D-vitamin-hiányt és a hiányállapot legmélyebb pontja mutat-e összefüggést a D-vitamin-hiánnyal összefüggésbe hozható betegségek gyakoriságával.

„Módszerek:” fejezetben az adott populáció főbb paramétereit taglalta. Kiemelte a VDR, az IL-6, és az IGF-1 gének polimorfizmusainak potenciális kapcsolatát a csúcs-csonttömeggel. Az IL1-ra gén, a CaSR gén, a RANK-RANKL-OPG és a Wnt jelátviteli út génjeinek vizsgálata során asszociációs módszerrel a menopauza utáni csontdenzitás és/vagy az osteoporosis gyakoriság összefüggését tanulmányozta. Kiemelte az osteoporosis hosszú távú gyógyszeres kezelésének hatékonyságával kapcsolatos kutatási eredményeit. A D-vitamin pótlás hatékonyságának meghatározására randomizált, kettősvak, kontrollált, multicentrikus vizsgálatot végzett, amelynek során 140 személyt szűrtek és közülük 67-et vontak be a vizsgálatukba. Beválasztási feltétel volt a legalább 18 éves életkor és az 50 nmol/l alatti szérumszint 25OHD-vitamin-szint. Kizáró okokat részletesen ismertette. A vizsgált személyeket három kezelési csoportba osztotta. Az "A" csoportban napi 1000 NE, a "B" csoportban heti 7000 NE, a "C" csoportban havi 30 000 NE D3-vitamin kezelést kaptak. A mérési és statisztikai módszerek fejezetben részletes leírást adott. Ki kell emelnem, hogy az alkalmazott módszerek korszerűek és alkalmasak a kitűzött célok eléréséhez a felett kérdések megválaszolásához.

„Eredmények” fejezetben részletesen mutatta be azokat az újszerű megfigyeléseket, amelyek közül több valóban egyedülálló a nemzetközi irodalomban is.

Az eredmények közül a következőket emelem ki és fogadom el:

1. Elsőként bizonyította, hogy a VDR, az IL-6 vagy az IGF-1 gének nem játszanak szerepet a csonttömeg genetikai meghatározásában.
2. Vizsgálati eredményei megerősítették a TNFSF11 gén két polimorfizmusának (rs9533156 és az rs9525641) az összefüggését a gerincen és a csípőtájon mért BMD értékekkel. Emellett egy harmadik SNP, az rs3742257 és a gerinc BMD szoros korrelációját is leírta. Elsőként igazolta, hogy ennek a három SNP-nek a 'CCT' haplotípusa kisebb BMD értékekkel társul és humán csontmintákban fokozott

TNFSF11 mRNS expresszióval jár. Szignifikáns összefüggést mutatott ki a TNFSF11B gén rs3102735 és rs1564858 polimorfizmusai és a postmenopauzás BMD értékek között. Ugyanakkor ez a két SNP nem befolyásolta a csontban az in vivo génexpresszió nagyságát. Ez alapján az rs3102735 és az rs1564858 inkább markere, mint hordozója a TNFSF11B gén csontokra gyakorolt hatásának.

3. A korábbi publikációkkal ellentétben nem mutatott ki összefüggést az IL-1ra gén 2. intronjában elhelyezkedő VNTR polimorfizmus, valamint a CaSR gén "A986S" polimorfizmus genotípusa és a menopauza utáni csontdenzitás között sem az osteoporotikus, sem a kontroll csoportban.
4. Postmenopausás populáción igazolta az LRP5 gén rs4988300 polimorfizmusának hatását a csípőtáji BMD-re. Ugyanakkor nem talált összefüggést az rs599083 és az rs634008 polimorfizmusok valamint a postmenopausában mért BMD értékek között.
5. Homogén, postmenopausás populációban nem talált összefüggést a GPR177 és az SP7 gén korábban vizsgált polimorfizmusai (rs2566755, rs1430742, rs1430742; rs2016266, rs191240606) és a BMD értékek, valamint a csonttörési kockázat között. Ez alapján a GPR 177 és az SP7 gén nem játszhat szerepet a menopauza utáni csontmennyiség kialakításában.
6. Elsőként igazolta, hogy az ADO2 génjét hordozó, azt örökítő személyben, nem változik sem a csont ásványianyag-tartalom, sem az ADO2-re jellemző laboratóriumi értékek: a TRAP és CK-BB.
7. Kimutatta, hogy hét éves időszakban a csonttritkulás talaján kialakult csonttörések száma nem nőtt, ellenkezőleg jelentősen, 46 %-al csökkent. Az évi 88 290 törésszám 47 747-re, ezen belül a csípőtáji törések száma 37,5 %-al, 17 992-ről 11 242-re csökkent.
8. Klinikai megfigyeléseik közül kiemelhető, hogy tél végén a D-vitamin értékek minden korábban mértnél alacsonyabbak. A D-vitamin értékek - sem a 25OHD, sem a szabadhormon értékek - nem követik a normál eloszlást. A népesség 94%-ának t-25OHD értéke nem érte el Magyarországon a normál tartomány alsó határának elfogadott 75 nmol/l-t, a 71% az 50 nmol/l-t és 30% pedig 30 nmol/l alatt volt. Nem talált összefüggést a kor, a nem, a lakhely, a munka típusa, a szabadban töltött idő és a t-25OHD értékek között. Csak a D-vitamin-pótlásnak és a meleg éghajlatra történő utazásnak volt hatása a tél végi t-25OHD értékekre. A nagyobb BMI érték kisebb DBP-vel társult és nem befolyásolta az f-25OHD értékeket. Ez alapján kérdésesnek találta a nagyobb BMI mellett mért kisebb t-25OHD biológiai jelentőségét. A t-

25OHD és f-25OHD értékek csak a kardiovaszkuláris kockázattal mutattak összefüggést.

9. Prospektív, randomizált, kontrollált, multicentrikus vizsgálattal igazolta, hogy a napi 1000NE-nek megfelelő D3-vitamin naponta, vagy hetente, vagy havonta egyszer történő adásának (napi 1000 NE, havi 7000 NE vagy havi 30 000 NE) 25OHD szérumszint emelő hatása és a kezelés biztonságossága azonos.
10. A FIO kezelésében elsőként általuk alkalmazott plazmaferézis 6 hónap alatt jelentősen csökkentette a beteg panaszait és javította a csont biokémiai markereket, párhuzamosan az M-komponens szérumszintjének csökkenésével.
11. Elsőként igazolta, hogy von Gierke betegségben májátültetést követően, az azt megelőzően extrém alacsony IGF-1 érték normalizálódásával párhuzamosan a növekedés is megindul és gyógyszeres kezelés nélkül, kalcium és D-vitamin-pótlás mellett a BMD rendeződik.

Kritikai észrevételeim, megjegyzéseim a következők:

1. A szerző több vizsgálatában is az immunológiában lényeges gének polimorfizmusát tanulmányozta. Ez a munka beleillik az új tudományág, az osteoimmunológia témakörébe, amely azzal a felismeréssel jött létre, hogy a limfociták által termelt citokinek hatással lehetnek a csontok homeosztázisra. Bár a proinflammatorikus citokinek és a csontosodás közötti kapcsolatok több vonatkozásban is ismertek, sokkal kevesebbet tudunk azokról a mechanizmusokról, amelyek megőrzik vagy visszaállítják a homeosztázist (azaz az egészséges állapotot). Valószínűleg mind az immunrendszerben, mind a csontrendszerben olyan visszacsatolási hurkoknak kell lenniük, amelyek patológiás (például fertőzések) és normál fiziológiás folyamatok (például terhesség) következtében fellépő változások után is visszaállítják és fenntartják a homeosztázist. A szabályozó T-sejtek (Treg) a CD4+T-sejtek egy fontos komponense, amely meghatározó szerepet játszik az autoreaktív T-sejtek negatív szabályozásában és a gyulladáshoz vezető paraméterek meghatározásában. Jól dokumentált, hogy a Treg számának és/vagy funkciójának csökkenése lymphoproliferációhoz vezethet és az autoimmun betegségeket indukáló immunológiai tolerancia lebontását eredményezheti (Buchwald ZS et al: A Bone Anabolic Effect of RANKL in a Murine Model of Osteoporosis mediated through FoxP3+ CD8 T-cells. J Bone Miner Res. 2015 Aug;30,1508-1522). Ugyanakkor beszámoltak arról, hogy a dehidroepiandroszteron (DHEA) elősegíti az osteoblasztok proliferációját és gátolja az oszteoblaszt apoptózist, és/vagy gátolja az osteoclastok érését. A DHEA növelte a Foxp3 + szabályozó T-sejtek (Tregs) számát a lépben, de

nem befolyásolta a CTLA-4-et vagy IL-10-et. Megállapították, hogy a DHEA javíthatja a posztmenopauzális osteoporozist az oszteoblaszt differenciálódás felfelé történő szabályozása („up regulation”) révén az osteoblastogenezishez kapcsolódó gének és a Foxp3 + Treg számának és funkciójának növekedésével. Kérdésem, hogy Takács István dr. vizsgálat-e ezt az összefüggést, megfigyelte-e a DHEA kedvező hatását, lehet-e összefüggés a DHEA gén és az osteoporosis gének expressziójában, ill co-expressziójában? Alkalmasként tartja-e a DHEA kezelést az osteoporosisban? (Qiu X et al: DHEA promotes osteoblast differentiation by regulating the expression of osteoblast-related genes and Foxp3+ regulatory T cells. *BioScience Trends*. 2015; 9, 307-314).

2. Szerző munkája során ismételtén utalt a genetikai és a környezeti faktorok komplex szerepére az osteoporosis kialakulásában. Kiemelte az oxidatív stressz potenciális szerepét. Ezen faktorok jelentőségéről napjainkban is több közlemény jelenik meg. (*Melough MM et al: The Role of AOPP in Age-Related Bone Loss and the Potential Benefits of Berry Anthocyanins. Nutrients* 2017, 9, 789; doi:10.3390/nu9070789). Mindezek alapján mi lehet a reaktív oxidatív folyamatok, az antioxidánsok szerepe az osteoporosis kezelésében és megelőzésében. Javasol-e a szerző antioxidáns kezelést?
3. Az olvasóban felvetődik, hogy a leírt genetikai adatok mellett az epigenetikai tényezők is szerepet játszhatnak a csontanyagcserében. Ismert ugyanis, hogy a DNS-metiláció befolyásolja a társult gének expresszióját, és hozzájárulhat a csontritkulás genomszerű társulási vizsgálataiból származó hiányzó genetikai hatásokhoz. Korábbiakban ugyanis a posztmenopauzás nőkben végzett vizsgálatok felhívták a figyelmet a csont CpG metiláció, transzkripciós szintek és a BMD / törés közötti erős kapcsolatra. (*Reppe S et al: Distinct DNA methylation profiles in bone and blood of osteoporotic and healthy postmenopausal women. Epigenetics*. 2017 Jun 26:0. doi: 0.1080/1559 2294.2017). Mely epigenetikai tényezők játszhatnak szerepet a csontanyagcserében és van-e ezeknek klinikai jelentőségük?
4. A Glükokortikoidok csontanyagcserére kifejtett hatásaira több helyen kitér a szerző, de a glükokortikoid receptor polimorfizmusát nem vizsgálta. Mi lehet ennek az oka? Az irodalmi adatok ugyanis felhívják a figyelmet autoimmun betegségek és ezen receptorok polimorfizmusának társulásaira (*Boyle B et al: Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in Graves' ophthalmopathy, Br.J.Ophthalmol*. 2008; 92;131-134), továbbá egyes szerzők kapcsolatot mutattak ki az osteoporosis, a vertebrális csonttörések és az N363S polimorfizmus között (*Morelli V et al: Role of glucocorticoid receptor*

polymorphisms in adrenal incidentalomas. Eur J Clin Invest, 40, 803-811 2010). Az emberi glükokortikoid receptor gén alternatív összekapcsolása két izoformot képez, a hGR α -t és a hGR β -t. A hGR β szabályozza hGR α aktivitást, de inherens transzkripciós aktivitással is rendelkezik, amely együttesen módosítja a glükokortikoid érzékenységet. (*Whirledge SD et al: Generating diversity in human glucocorticoid signaling through a racially diverse polymorphism in the beta isoform of the glucocorticoid receptor. Lab. Invest. 2017 Jul 31. doi: 10.1038 /labinvest. 2017.76.*).

A fentebb vázolt kritikai észrevételek, kérdések nem érintik a disszertáció új megállapításainak lényegét. Külön kiemelem a disszertáció logikus felépítését, szép kivitelezését, olvasmányosságát, a magyar orvosi nyelv szabályainak betartását.

Összegezve megállapítható, hogy Dr. Takács István MTA doktori értekezése minden tekintetben megfelel a követelményeknek, nyilvános vitára bocsátását javaslom és magam részéről az értekezést elfogadom.

Budapest, 2017.08.21.

Dr. Balázs Csaba D.Sc.
az orvostudomány doktora